

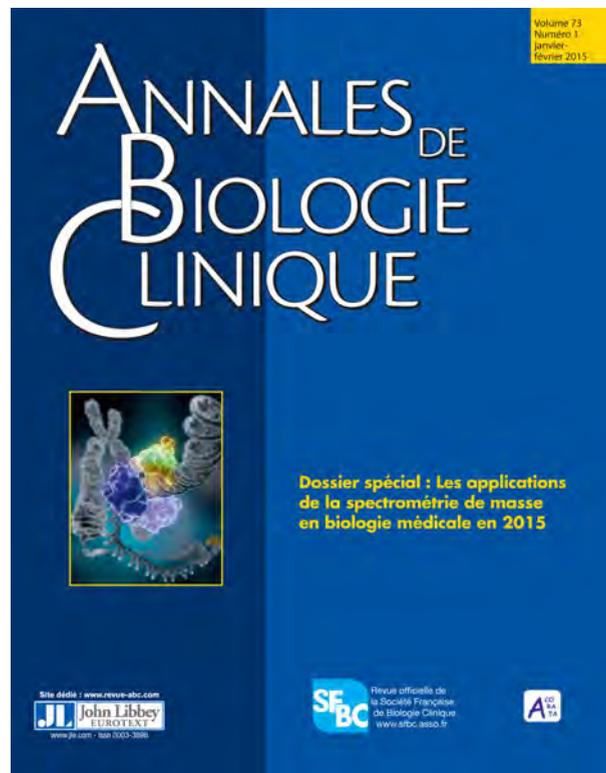


L'essentiel de l'information  
scientifique et médicale

[www.jle.com](http://www.jle.com)

**Le sommaire de ce numéro**

[http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio\\_rech/abc/sommaire.md?type=text.html](http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/bio_rech/abc/sommaire.md?type=text.html)



**Montrouge, le 14/01/2015**

Christophe Hirtz

**Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article au format électronique (pdf) :**

Le prélèvement sanguin sur papier buvard : une révolution de la biologie médicale en marche ?

**paru dans**

Annales de biologie clinique, 2014, Volume 73, Numéro 1

**John Libbey Eurotext**

*Ce tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles ou scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire.*

*Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.*

© John Libbey Eurotext, 2014

# Le prélèvement sanguin sur papier buvard : une révolution de la biologie médicale en marche ?

## Blood sampling using "dried blood spot": a clinical biology revolution underway?

Christophe Hirtz  
Sylvain Lehmann

Institut de recherche en biothérapie,  
Hôpital Saint Eloi, CHU Montpellier,  
France ; Laboratoire de biochimie  
clinique de la protéomique et CCBHM,  
Université Montpellier 1, Montpellier,  
France ; Inserm, F-34000 U1040,  
Montpellier, France  
<c-hirtz@chu-montpellier.fr>

**Résumé.** L'analyse de sang déposé et séché sur un papier buvard (*dried blood spot* ou DBS) est utilisée depuis les années 1960 en analyse clinique, principalement dans le cadre du dépistage néonatal (test de Guthrie). Depuis lors, de nombreux analytes cliniques tels que les acides nucléiques, les petites molécules ou les lipides, ont été mesurés avec succès sur les DBS. Bien que cette méthode pré-analytique représente une alternative intéressante aux prélèvements sanguins classiques, son utilisation en routine est encore limitée. Nous passons ici en revue les applications du prélèvement sanguin sur DBS en analyse clinique et nous évaluerons sa place dans le futur, soutenue par les nouvelles méthodes d'analyse comme la spectrométrie de masse LC-MS.

**Mots clés :** *dried blood spot, pré-analytique, PCR, spectrométrie de masse, Elisa, multiplexe*

**Abstract.** Blood testing using the dried blood spot (DBS) is used since the 1960s in clinical analysis, mainly within the framework of the neonatal screening (Guthrie test). Since then numerous analytes such as nucleic acids, small molecules or lipids, were successfully measured on the DBS. While this pre-analytical method represents an interesting alternative to classic blood sampling, its use in routine is still limited. We review here the different clinical applications of the blood sampling on DBS and estimate its future place, supported by the new methods of analysis as the LC-MS mass spectrometry.

**Key words:** *dried blood spot, pre-analytical, PCR, mass spectrometry, ELISA, multiplex*

Il y a maintenant plus d'un siècle, Ivar Bang [1], décrivait une méthode de prélèvement sanguin non invasive sur buvard comme alternative au prélèvement sanguin classique. Ce prélèvement, le « *dried blood spot* » ou DBS est basé sur le dépôt d'une goutte de sang sur un papier buvard adapté et qui est séchée avant conservation et analyse. En 1963, Robert Guthrie a utilisé cette technique pour développer le dépistage néonatal systématique de la phénylcétonurie [2]. Mise en place pour la première fois en Ecosse, l'utilisation du DBS a été étendue chez le nourrisson au Royaume-Uni dans les années soixante-dix, principalement pour détecter les erreurs innées du métabolisme qui peuvent faire l'objet d'une prise en charge thérapeutique. Actuellement, l'utilisation du DBS reste presque exclusivement

limitée au dépistage néonatal, même si de nombreuses études démontrent son application potentielle en biologie médicale, ainsi qu'en recherche clinique. En effet, les analyses de petites molécules de lipides, d'acides nucléiques ou encore de protéines sont toutes parfaitement adaptées à l'usage de DBS. Cependant, une des limites du prélèvement sanguin sur DBS est le faible volume de sang obtenu (5 à 10  $\mu$ L par prélèvement) et, par conséquent, la nécessité d'utiliser des méthodes analytiques très sensibles. Les progrès technologiques récents comme la microfluidique, les systèmes de détection immunologique/génomique multiplexes et la spectrométrie de masse pourraient toutefois résoudre la plupart des problèmes de sensibilité. Dans cette revue, nous allons résumer les avantages et les inconvénients de cette méthode de prélèvement sanguin singulière et évaluer son rôle futur en biologie médicale.

**Tirés à part :** C. Hirtz

## Procédure générale de l'utilisation du DBS

### Prélèvement

La zone de prélèvement (doigt, talon) doit être préalablement désinfectée. La peau est ensuite percée à l'aide d'une lancette stérile (*figure 1*). La première goutte de sang est essuyée puis les gouttes suivantes sont placées sur le papier buvard afin de remplir la zone indiquée sur le DBS (cercle). Une fois que tous les cercles imprimés sur le papier buvard requis sont remplis, il est séché pendant quelques heures à température ambiante sur une surface non absorbante. Le temps de séchage est très important car l'humidité résiduelle favorise le développement de bactéries ou de moisissures et peut modifier l'étape d'extraction [3].

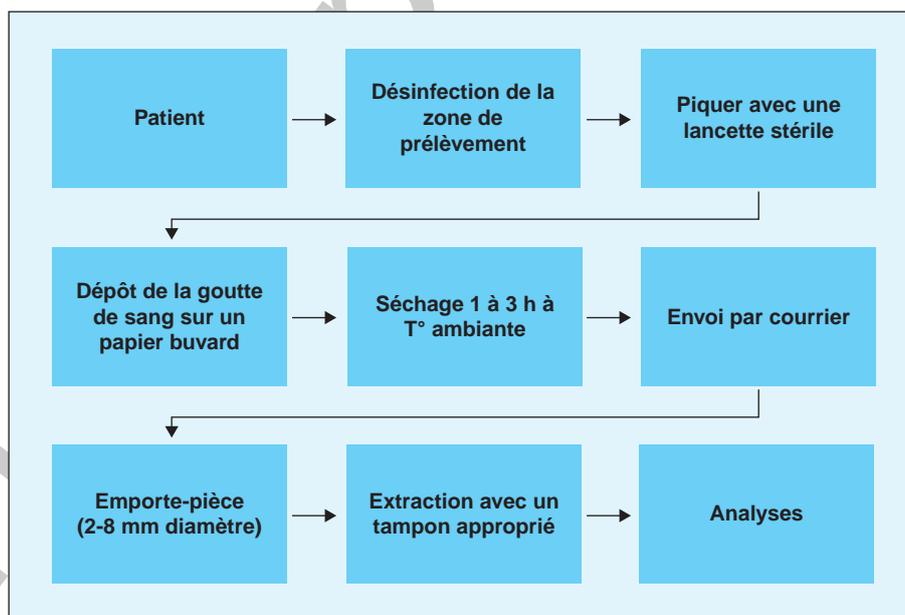
### Conservation

Une fois séchées, les cartes DBS sont placées dans un sac plastique étanche, éventuellement avec un sachet de dessicant et un indicateur d'humidité [4]. Le dessicant vise à parachever le processus de séchage afin de réduire tout risque d'infection lié au prélèvement sanguin. Le temps de conservation possible à température ambiante varie selon la nature de l'analyte, d'une semaine pour les protéines [4] à un an ou plus pour les acides nucléiques [5]. Dans le cadre des sérologies, les papiers buvards sont habituel-

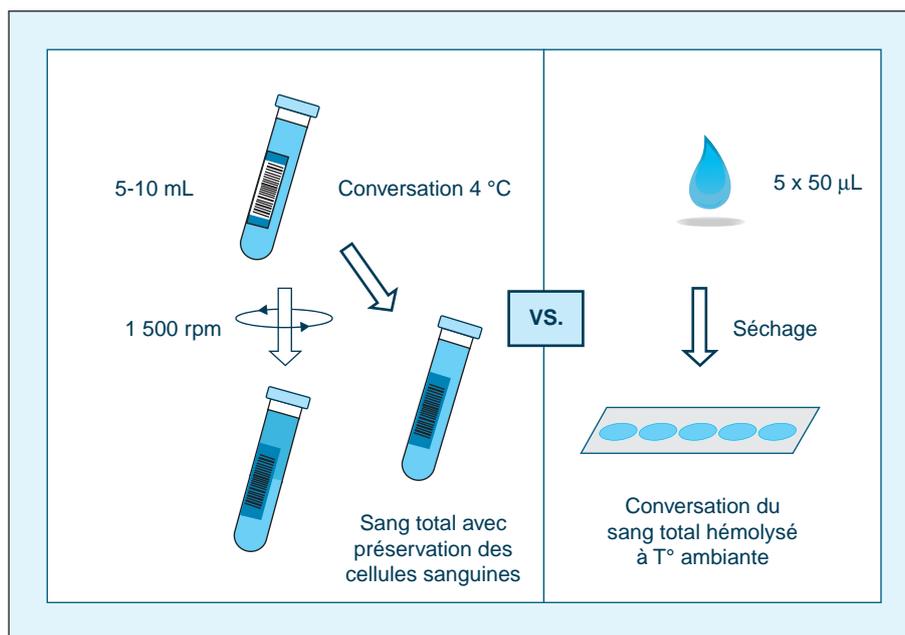
lement conservés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  dès réception au laboratoire [6]. Pour la préservation à long terme (jusqu'à plusieurs années), les papiers buvards sont stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  [7, 8].

### Extraction

L'extraction des analytes des papiers buvards doit être réalisée en utilisant une procédure standardisée. Un ou plusieurs disques de 2 à 8 mm de diamètre sont découpés avec un emporte-pièce spécifique. Ces « spots » sont alors placés dans un tampon d'élution pendant une durée variable selon la procédure d'extraction. L'échantillon extrait du DBS est alors traité comme un échantillon de sang total hémolysé et analysé par des méthodes classiques souvent destinées au plasma ou au sérum. La nature du tampon d'élution joue un rôle majeur dans la resolubilisation des analytes à tester. Une grande variété de tampons d'élution a été décrite dans la littérature dont les plus communs sont des tampons salins, souvent supplémentés avec des détergents (tween, triton), des protéines porteuses (albumine) et des chélateurs (EDTA). Les solvants organiques (acétonitrile, méthanol ou éthanol) sont aussi de bons tampons d'élution pour l'extraction des protéines par exemple. Concernant les acides nucléiques, les kits commerciaux standards d'extraction qui sont compatibles avec les analyses de biologie moléculaire (PCR, puces à ADN...) peuvent être utilisés sur les spots de DBS [9].



**Figure 1.** Processus de prélèvement sanguin sur *dried blood spot* (DBS). Le patient réalise le prélèvement de sang périphérique à domicile. Il désinfecte la zone (doigt) et perce la peau avec une lancette stérile avant de déposer les gouttes de sang sur le papier buvard dans les cercles indiqués. Le DBS est séché de 1 à 3 heures à température ambiante et envoyé par courrier en utilisant une enveloppe classique. Au laboratoire, le DBS est conservé à température ambiante. L'échantillon est perforé (2-6 mm) et les analytes sont extraits à l'aide d'un tampon approprié avant l'analyse.



**Figure 2.** Comparaison du prélèvement sanguin sur *dried blood spot* (DBS) vs prélèvement de sang classique, conduisant à une réduction du volume de prélèvement sanguin de 100 fois et une facilité de stockage supérieure.

## Avantages et inconvénients du DBS

L'un des principaux avantages du prélèvement sanguin sur papier buvard est qu'il permet l'accès au prélèvement sanguin dans des situations où le prélèvement est difficile (éloignement géographique, précarité veineuse, problème de stockage). Le prélèvement type sur DBS contient environ 50 µL de sang sur un disque ayant une superficie moyenne de 12 mm<sup>2</sup> (figure 2). Il permet l'analyse de différents analytes tels que les acides nucléiques, les protéines, les lipides ou les petites molécules organiques et non organiques (tableau 1). Il existe actuellement deux types principaux de papiers buvards pour les prélèvements : le papier-filtre coton de différentes qualités (Whatmann 903 protein saver cards, Whatmann, Springfield Mill, UK ; Perkin Elmer 226 Spot Saver card, Perkin Elmer, Waltham, USA) et le papier-filtre en microfibre de verre (Agilent Bond Elut DMS, Santa Clara, USA ; Sartorius verre microfibre filtre, Goettingen, Allemagne). La principale différence entre ces deux supports est que la fibre de verre, de par sa nature, ne s'imprègne pas des analytes, ce qui permet de diminuer l'adsorption non spécifique. Il existe aussi une nouvelle génération de DBS (Noviplex cards, Shimadzu) qui est en cours de commercialisation et qui apporte une plus-value importante dans la mesure où il permet de collecter séparément le plasma et les cellules sanguines indépendamment de l'hématocrite. Ce nouveau type de DBS est extrêmement intéressant dans le cadre des applications en spectrométrie de masse

quantitative LC-MS/MS en particulier car il permet d'éviter le bruit de fond généré par la présence de l'hémoglobine.

En comparaison avec les tests sanguins classiques, le DBS offre des avantages pratiques, cliniques et financiers. Tout d'abord, le prélèvement sanguin sur DBS est facile à réaliser et indolore (figure 1). Il peut être réalisé par le patient à domicile, évitant de se rendre dans des structures spécialisées comme les laboratoires d'analyses médicales. Ce prélèvement capillaire étant beaucoup moins invasif que la ponction veineuse, il est mieux adapté pour les patients nécessitant de nombreuses analyses de sang, en particulier ceux possédant des veines endommagées ou fragiles comme les utilisateurs de drogues intraveineuses, les personnes âgées ou les enfants. L'utilisation du DBS permet également de minimiser le volume de sang prélevé sur les patients (250 µL vs 5 mL). Par ailleurs, il a été démontré que le séchage de la goutte de sang sur le DBS entraîne l'inactivation des virus (CMV, VHC, VIH, HTLV) [10] grâce à la perte de l'intégrité de leur capsid virale. Ce processus permet de réduire tout risque de contamination du personnel médical ou paramédical [11]. En outre, elle permet l'expédition des échantillons par simple courrier sans risque particulier de contamination. Cela représente donc un atout précieux pour la réalisation d'un prélèvement sanguin dans les collectivités éloignées d'un laboratoire d'analyses médicales ou par manque d'infrastructures techniques disponibles [12]. Grâce à sa petite taille et à sa capacité de stockage, le prélèvement sur DBS est également

**Tableau 1.** Aperçu de l'utilisation des DBS en chimie clinique autre que son utilisation pour le dépistage néonatal.

Méthodes analytiques	Paramètres	Intérêt clinique	Références
<b>Acides nucléiques exogènes</b>			
PCR Temps réel Q-PCR	Herpes virus humain type 6	Différenciation active herpes virus humain type 6 (infection héréditaire HHV-6)	[19, 44]
RT-PCR	Hépatite C humaine	Infection hépatite C (VHC) chez les utilisateurs de drogues injectables	[6, 21]
PCR Temps réel	Hépatite B humaine	Virus hépatite B (HBV) quantification ADN	[45]
PCR Temps réel Q-PCR	Cytomégalovirus	Diagnostic de l'infection congénitale à cytomégalovirus humain	[18, 46]
Nested PCR, RNA assays, RT-PCR	Virus VIH	Détection du virus de l'immunodéficience humaine	[7, 21, 47]
<b>Peptides/protéines</b>			
Elisa	Virus VIH	Sérotypage du virus de l'immunodéficience humaine	[48]
Elisa	Protéine C-réactive	Risque cardiovasculaire	[49]
Delfia	Gonadotrophine chorionique humaine libre ( $\beta$ -hCG libre) et PAPP-A	Risque aneuploïdie fœtale	[50]
Dosage immuno-fluorométrique	LH et FSH	Concentration gonadotrophine circulante	[51]
Immunodosage chimiluminescent	Antigène prostatique spécifique (PSA)	Cancer de la prostate	[52]
RIA	Somatedine-C (IGF-1)	Dépistage de la déficience en hormone de croissance	[53]
Elisa	Apolipoprotéines B	Hypercholestérolémie	[54]
Immunonéphélométrie	Alpha 1-antitrypsine	Déficience en alpha 1-antitrypsine	[4]
Elisa	Alpha-foetoprotéine	Ouverture tube neural et trisomie	[55]
Dosage enzymatique	Biotinidase	Déficit en biotinidase	[56]
EIA	Peptide relié au gène calcitonine (PRGC)	Autisme et retard mental chez l'enfant	[57]
LC-MS/MS	Céruloplasmine	Maladie de Wilson	[17]
Spectrophotométrie	Hémoglobine	Analyse des folates	[58]
Dosages immunologiques turbidimétriques	Hémoglobine glyquée HbA1c	Diagnostic et traitement du diabète	[23]
LC-MS/MS	HbA2	Diagnostic de la thalassémie	[59]
HPLC non-radiochimique	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase	Troubles du métabolisme des purines	[60]
LC-MS/MS	Iduronate 2-sulfatase	Diagnostic de la maladie de Hunter	[61]
Elisa, RIA	Facteurs de croissance Insulin-like	Évaluation du statut pubertaire	[62]
Elisa	Prolactine	Diagnostic de l'épilepsie	[63]
Elisa	Récepteur transferrine	Déficit en fer	[64]
Delfia	Thyroglobuline	Statut thyroïdien	[65]
Elisa	CD4	Comptage des lymphocytes CD4+ chez les patients VIH	[66]
Elisa	La rougeole et la rubéole IgM et IgG	Détection de la rougeole et de la rubéole	[67]
Delfia	<i>Toxoplasma gondii</i> IgM et IgA	Détection de la toxoplasmose congénitale	[68]
RIA	Insuline	Diagnostic de l'hyperglycémie/hyper-insulinémie	[69]

Tableau 1. (Suite)

Dosage enzymatique	Acid alpha-glucosidase	Glycogénose II	[70]
Dosage enzymatique	Enzymes lysosomales	Distinction clinique mucopolysaccharidoses, oligosaccharidoses, et mucolipidoses II et III	[71]
Dosage enzymatique	Activité $\alpha$ -iduronidase	Diagnostic de la maladie de Hurler	[72]
Biochimie	Acide phytanique et acide pristanique	Désordres peroxysomales	[73]
Électro-immunodiffusion	Bêta-lipoprotéine	Hyperlipidémie familiale type II	[74]
Elisa	Fumarylacétoacétate	Tyrosinémie héréditaire I	[75]
Luminex	TGF- $\beta$ 1, (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , NT-4, BDNF, RANTES, CRP, MMP-9...)	Statut inflammatoire	[76]
Immunodosage enzymatique	IgE	Allergies et infections macro-parasitaires	[77]
Elisa	IgG et IgA	Carcinome nasopharyngé	[24]
Dosage enzymatique	$\beta$ -galactosidase lysosomale	Mucopolysaccharidose type IV	[78]
Immunodosage fluorométrique	Thyréostimuline 17-hydroxy-progestérone Trypsine immunoréactive (TIR) Créatinine kinase et isoenzymes	Hypothyroïdisme congénital Hyperplasie congénitale des surrénales Mucoviscidose Dystrophie musculaire	[79]
Chromatographie sur colonne	Globuline liant la thyroxine	Hypothyroïdisme néonatal	[80]
Immunodosage	Trypsine immunoréactive	Mucoviscidose	[81]
Elisa	Anticorps anti VHA	Détection virus hépatite A	[20, 82]
Elisa	Anticorps anti HBc	Détection virus hépatite B	[83]
Corecell	Anticorps maternels anti HBc	Détection virus hépatite B	[84].
Elisa	Anticorps anti VHC	Détection virus hépatite C	[12, 85]
Elisa	Anticorps anti paludéens	Diagnostic de la malaria	[86]
Elisa	Anticorps anti <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Détection <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez les patients atteints de mucoviscidose	[87]
Elisa	Anticorps anti thyroïdien	Pathologie thyroïdienne	[88]
Elisa	Anticorps anti tétanos	Détection du tétanos et des toxines diphtériques	[89]
Elisa	Anticorps anti Brucella	Diagnostic de la brucellose	[90]
Elisa	Anticorps anti Cysticercus	Cysticercose	[91]
Elisa	Anticorps anti HTLV-1 et HTLV-2	Détection du virus T-lymphotropique humain	[92]
Immuno-fluorescence	Anticorps anti <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Bartonella quintana</i> et <i>Rickettsia conorii</i>	Diagnostic des rickettsioses	[93]
Elisa	Anticorps anti syphilis	Diagnostic de la syphilis	[94]
Hémagglutination indirecte	Anticorps anti treponema	Diagnostic de la syphilis	[95]
Elisa	Anticorps anti <i>Trypanosoma cruzi</i>	Diagnostic de la trypanosomiase humaine	[96]
Elisa	Anticorps anti <i>Trichomonas vaginalis</i>	Diagnostic de la trichomonose uro-génitale	[97]
Fluorescence	Galactose-1-phosphate uridylyltransférase [GALT]	Galactosémie	[98]
Elisa	Anticorps anti virus Epstein Barr	Diagnostic du virus Epstein-Barr	[24]
EIA	Anticorps anti virus Rubella	Détection du virus Rubella congénital	[25]
EIA	Anticorps anti virus dengue	Diagnostic virus dengue	[26]
Elisa	Anticorps anti hépatite A	Diagnostic hépatite A	[20, 82]

Tableau 1. (Suite)

Elisa	Anticorps anti HBc	Détection virus hépatite B	[83]
Corecell	Anticorps maternel anti hépatite B	Diagnostic hépatite B	[84]
Elisa	Anticorps anti hépatite C	Détection des anticorps anti hépatite C	[12, 85]
MLPA	Détection des délétions 22q11.2	Manifestations associées au syndrome DiGeorge	[99]
PCR	Détection des variants géniques GSTM1 et GSTT1	Recherches de gènes de susceptibilité au cancer pédiatrique	[41]
Elisa multiplexe	Papillomavirus humain (HPV), <i>Helicobacter pylori</i> ( <i>H. pylori</i> ), hépatites C (VHC), et JC polyomavirus (JCV)	Infections à Papillomavirus humain (HPV), <i>Helicobacter pylori</i> ( <i>H. pylori</i> ), hépatites C (VHC), et JC polyomavirus (JCV)	[100]
<b>Lipides et petites molécules</b>			
Densitométrie	Phénylalanine	Phénylcétonurie	[2]
Méthode enzymatique	Triglycérides	Evaluation du risque cardiométabolique	[32]
LC-MS/MS	Acides aminés, organiques et gras	Désordres métaboliques	[31]
HPLC fluorimétrique	Homocystéine	Homocystéinurie	[101]
Méthode enzymatique	Dosage du glucose	Suivi des patients diabétiques	[102]
LC-MS/MS	17-OHP, androstènedione	Hyperplasie congénitale des surrénales	[103]
HPLC	Vitamine A	Rétinolémie	[104]
LC-MS/MS	Thyroxine (T4) et TSH	Hypothyroïdisme congénital	[105]
Chimiluminescence	Free thyroxine (FT4)	Evaluation du statut thyroïdien	[106]
LC-MS/MS	Carnitine libre	Erreurs innées du métabolisme	[107]
GC-MS	Méthylcitrate	Dépistage néonatal de l'acidémie propionique	[108]
GC-MS	Octanoate, decanoate, acide cis -4- décénoïque et acide cis -5-tetra décénoïque	Acides gras libres	[109]
LC-MS/MS	Succinylacétone	Tyrosinémie hépatorénale	[110]
FIA-ESI-MS/MS	Guanidinoacetate et créatine	Erreur innée dans la synthèse de la créatine	[111]
<b>Xénobiotiques</b>			
LC-MS	Agents antirétroviraux VIH (NVP, SQV, ATV, APV, DRV, RTV, LPV, EFV, ETV)	Suivi thérapeutique VIH	[36, 112]
RIA	Métabolite de la cocaïne (benzoylecgonine)	Exposition maternelle des nouveau-nés à diverses substances, y compris des drogues toxicomanogènes	[113]
LC/MS	Quinine, mefloquine, sulfadoxine, pyriméthamine, lumefantrine, chloroquine	Suivi thérapeutique paludisme et pneumonie	[34, 114]
Chromatographie phase gazeuse	Dichlorodiphényldichloroéthylène	Charge corporelle des polluants environnementaux des nouveau-nés	[115]
Immunodosage Polarisation Fluorescence	Théophylline	Suivi thérapeutique	[116]
<b>Génomique</b>			
PCR	Mutations du facteur V G1691A (FVL), prothrombine (PT) G20210A, 5'10'méthylènetetrahydrofolate réductase (MTHFR) C677T, et méthionine synthase (MS) A2756G	Sensibilité au thromboembolisme veineux	[117]

Tableau 1. (Suite)

PCR temps réel	Mutation C.-32T>G (IVS1-13>G)	Déficit en maltase acide	[118]
Dosage ADN	Mutation (IVS4+919G->A)	Maladie de Fabry	[119]
DHPLC	Substitution (c.840C>T)	Amyotrophie spinale	[120]
Méthode de digestion par enzyme de restriction	Mutation (c.985A>G)	Déficit en medium chaîne acyl-CoA déshydrogénase) (MCADD)	[121]
PCR	Mutation du gène <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> (CFTR)	Mucoviscidose	[122]
PCR	Mutation ADN	Bêta thalassémie	[42]
PCR PCR temps réel	Délétions SMN1 exon 7 Variations quantités de SMN1 et SMN2	Amyotrophie spinale	[40]
PCR	Méthylation FMR1	Syndrome du X fragile	[39]
MLPA	Délétions 22q11.2	Manifestations associées avec le syndrome de DiGeorge	[99]
PCR	Variant génique GSTM1 et GSTT1	Recherche des gènes de susceptibilité au cancer pédiatrique	[41]
GC-MS	Octanoate, décanoate, acide cis -4- décénoïque (C10:1) et acide cis -5-tetra décénoïque	Acide gras libre	[109]
LC-MS/MS	Succinylacétone	Tyrosinémie hépatorénale	[110]
FIA-ESI-MS/MS	Guanidinoacétate et créatine	Erreur innée dans la synthèse de créatine	[111]

une solution intéressante afin de faciliter la conservation des échantillons dans les laboratoires cliniques et dans les bio-banques [13]. Il est à noter qu'en cas de stockage des DBS, il est conseillé de séparer les prélèvements à l'aide d'un ensachage individuel ou d'une séparation avec un papier adapté afin d'éviter les risques de contamination croisée entre les buvards [3]. Ces propriétés du prélèvement sur DBS ont d'ores et déjà montré leur efficacité en recherche expérimentale, en facilitant les études pharmacologiques et pharmacocinétiques sur petits animaux, notamment grâce aux volumes très limités des liquides biologiques nécessaires. Ceci fait suite à la réglementation en place visant à protéger les petits animaux (diminution de volume de l'échantillon) au cours des études précliniques. Concernant la stabilité de l'échantillon sanguin, de nombreuses études ont montré que la plupart des analytes du sang total sont stables à température ambiante pendant au moins sept jours. Dans certains cas comme les opiacés ou les acides nucléiques, le prélèvement sur DBS permet d'augmenter leur stabilité [14], de plusieurs mois à température ambiante à plusieurs années à  $-20^{\circ}\text{C}$  [15]. D'un point de vue médico-économique, il est intéressant de noter que l'utilisation du DBS permet une réduction importante des coûts en raison principalement de la diminution de la nécessité en personnel formé, de la facilité de transport, de stockage et de traitement.

L'inconvénient majeur du prélèvement sanguin sur DBS réside dans la nature de l'échantillon biologique elle-même (figure 2). Dans une procédure de prélèvement sanguin standard, soit le sérum ou le plasma sont analysés, alors que les prélèvements sanguins sur DBS sont composés

de sang total hémolysé. Par conséquent, des perturbations analytiques dues à l'hémoglobine et à la libération du contenu intracellulaire des cellules sanguines peuvent se produire. Par ailleurs, comme ces cellules (érythrocytes, leucocytes, plaquettes, etc.) sont altérées durant le processus de séchage, les analyses hématologiques cellulaires sont donc impossibles. Le processus de séchage du DBS peut également entraîner la dégradation de certaines protéines et peut altérer l'activité enzymatique des protéines sanguines (aminotransférases...). La présence des protéines cellulaires dans les échantillons de DBS va aussi changer la gamme dynamique des protéines et donc modifier la concentration de certaines substances à analyser. Dans certains cas, les seuils décisionnels cliniques déterminés à l'aide d'échantillons de sang standard doivent alors être adaptés. L'hématocrite doit également être pris en compte car il peut affecter la dispersion de la goutte de sang sur le papier buvard [16]. Le faible volume sanguin résultant du prélèvement sur le DBS peut aussi constituer un inconvénient pour les analyses avec une faible sensibilité [11] et pour la réalisation de dosages multiples.

### Utilisation du prélèvement DBS en chimie clinique

La principale utilisation du DBS en France concerne le dépistage néonatal systématique. Le prélèvement de sang chez le nouveau-né étant difficile, la technologie DBS représente donc une alternative viable. En France, le prélèvement

sur DBS a été mis en place en 1978 par l'Association française de dépistage et de prévention des handicaps de l'enfant (<http://www.afdphe.org/>). Le prélèvement de sang capillaire chez les nouveau-nés permet la détection de la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales, la mucoviscidose et la drépanocytose. L'extension de ces tests pour couvrir un plus grand nombre de maladies infantiles est actuellement à l'étude [17]. Dans tous les cas, un résultat positif sera toujours confirmé ou infirmé par des tests spécifiques complémentaires. Au-delà de son utilisation pour le dépistage néonatal, de nombreux analytes cliniques peuvent être mesurés à partir d'un prélèvement sanguin sur DBS. Ces analytes peuvent être divisés en cinq grandes catégories comme suit (voir également *tableau 1*).

### Acides nucléiques exogènes

La détection des acides nucléiques est généralement requise dans le domaine de la virologie. Il existe d'ailleurs un intérêt croissant pour le dépistage viral grâce à la détection des acides nucléiques (ARN, ADN) à partir des DBS. Les technologies actuelles de biologie moléculaire (Q-PCR, RT-PCR) utilisées en virologie sont très sensibles et nécessitent un faible volume d'échantillons (< 20 µL). Néanmoins, il est important de prendre en compte que la quantité de matériel génétique disponible à partir d'un prélèvement DBS est 1 à 2 logs inférieurs par rapport à un échantillon de sérum ou de plasma standard. En ce qui concerne la conservation des acides nucléiques sur le papier buvard, elle est stable pendant de longues périodes lorsque le DBS est correctement séché et stocké à l'abri de l'humidité dans un sac en plastique approprié contenant un sachet dessiccant [3]. La détection des acides nucléiques à partir du DBS est principalement utilisée dans le dépistage de maladies virales comme le cytomégalovirus [18], le virus de l'herpès simplex [19], l'hépatite A [20], l'hépatite C [21] et le VIH [22].

### Peptides - protéines

Concernant les protéines et les peptides, il existe une difficulté relative concernant leurs extractions du papier buvard, nécessitant des mises au point expérimentales. Il faut aussi tenir compte de la faible sensibilité de certains dosages de protéines. Les principales protéines mesurées à partir du DBS peuvent être classées en deux groupes : les protéines sériques standard et les anticorps. Actuellement, les techniques analytiques les plus largement utilisées sont les tests immunologiques qui permettent de mesurer les analytes cliniques avec une bonne spécificité et sensibilité. Par

exemple, le dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) à partir du papier buvard réalisé par test immunoturbidométrique, permet de surveiller l'équilibre glycémique chez le patient diabétique avec la même efficacité que le prélèvement sanguin. La stabilité de l'HbA1c sur le DBS est supérieure à 4 semaines à température ambiante [23]. Par ailleurs, l'utilisation du prélèvement sur DBS est aussi bien adapté pour la détection Elisa (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) d'anticorps spécifiques dirigés contre le virus Epstein-Barr [24], le virus de la rubéole [25], le virus de la dengue [26], le virus de l'hépatite C [6, 12] et le virus VIH [21]. Grâce aux récents développements technologiques et méthodologiques en spectrométrie de masse (LC-MS/MS), il est possible de réaliser des dosages quantitatifs de peptides et de protéines à partir d'échantillons biologiques complexes [27]. Cette approche ciblée a été utilisée pour mesurer la céruloplasmine dans le dépistage néonatal de la maladie de Wilson [17] et pour la quantification du peptide C [28] à partir des prélèvements sanguins sur DBS. Un intérêt majeur de ces développements LC-MS est la possibilité de multiplexer le dosage de protéines d'intérêts (méthode MRM, *multiple reaction monitoring*) à partir de quelques microlitres d'échantillon [27]. Par exemple, Chambers *et al.* [29] ont réussi à quantifier un panel de 40 protéines sériques à partir d'un prélèvement sanguin sur DBS grâce à une approche de type MRM.

### Les lipides, les glucides et les petites molécules

La phénylalanine, un acide aminé mesuré dans le dépistage de la phénylcétonurie des nouveau-nés, illustre bien le dosage des petites molécules à partir du DBS [2]. En termes de stabilité, les petites molécules organiques se révèlent beaucoup moins sensibles que les protéines au processus de séchage qui caractérise les DBS. Aussi, les progrès majeurs en spectrométrie de masse dans le domaine des petites molécules a permis la quantification de nombreuses analytes comme la vitamine D ou certains lipides [30, 31]. Par exemple, des niveaux élevés de triglycérides qui représentent un risque important de maladies cardio-vasculaires et coronariennes, peuvent être quantifiés à partir du DBS. Ces analytes restent stables sur le papier buvard pendant 35 jours à température ambiante et jusqu'à 90 jours à 4 °C [32]. Récemment, le profilage des glycanes à partir de DBS a été développé par spectrométrie de masse [33]. Cette méthode permet la quantification relative de 44 glycanes avec un coefficient de variation de 20 %, ce qui est similaire aux résultats obtenus à partir du sérum. En termes de conservation, les glycanes se conservent parfaitement au moins un mois à température ambiante.

## Xénobiotiques

La détection des xénobiotiques à partir de DBS a joué un rôle important dans le suivi des médicaments anti-paludiques et antirétroviraux par spectrométrie de masse (LC/MS) dans les populations isolées [34]. En 1993, Henderson *et al.* [35] ont démontré l'intérêt de l'utilisation du prélèvement sur DBS pour la détection des stupéfiants comme la cocaïne, grâce à la modification d'un kit commercial de dosage radio-immunologique (RIA). Un autre exemple représentatif de l'intérêt du DBS est la quantification par LC/MS de 9 molécules antirétrovirales utilisées lors de l'infection par le VIH. Cette méthode de quantification a été validée par la *Food and drug administration* (FDA) et a permis de démontrer une stabilité des échantillons jusqu'à 90 jours à température ambiante [36]. Le développement de ces nouvelles techniques de détection/quantification multiplexe des xénobiotiques par spectrométrie de masse LC/MS va permettre d'accroître considérablement l'intérêt de l'utilisation du DBS en biochimie clinique.

## Génomique

Le potentiel clinique du prélèvement sanguin sur DBS dans le domaine de la génomique a été démontré dès 1987 [37]. Ainsi, la micro-extraction d'ADN à partir du DBS a permis la détection de mutations responsables de maladies telles que la fibrose kystique [38], le syndrome de l'X fragile [39], l'atrophie musculaire spinale [40], certains cancers [41] et la thalassémie [42]. Plus généralement, le DBS, qui est un prélèvement dont le stockage est simple et peu coûteux, est également un bon choix pour la constitution de biobanques de matériels génétiques [43]. Par exemple, la biobanque nationale danoise utilisée dans le cadre du dépistage néonatal (DNSB) comprend plus de 2 millions de DBS, ce qui correspond presque à tous les nouveau-nés danois depuis 1982.

## Conclusion

L'utilisation du prélèvement sur DBS peut être une réelle alternative au prélèvement sanguin classique dans la mesure où il présente de nombreux avantages sur le plan de la facilité de prélèvement, du transport, du stockage et de son innocuité tout en procurant d'excellents résultats d'analyse. Le prélèvement peut être réalisé à domicile en toute sécurité par le patient lui-même et il est ensuite envoyé par simple courrier au laboratoire d'analyse. Comme nous l'avons vu au cours de cette revue, de nombreuses molécules sont déjà analysables à partir du

prélèvement sanguin sur DBS. De nouveaux analytes vont pouvoir suivre grâce à des approches novatrices telles que la spectrométrie de masse quantitative ciblée, ainsi que le développement de systèmes de préparation des échantillons de DBS, entièrement automatisés. Ainsi, la détection et le suivi des maladies métaboliques, des maladies infectieuses et chroniques pourraient donc dans l'avenir se fonder sur l'utilisation du DBS. Actuellement, plusieurs laboratoires publics et privés en Europe et en Amérique du Nord commercialisent des kits de prélèvement sur DBS pour le dosage d'une gamme importante d'analytes cliniques souvent regroupés en panel pour le dépistage de maladies hormonales, métaboliques ou cardiovasculaires. La démocratisation de l'utilisation du DBS pourrait correspondre à une évolution voire une révolution de la biologie clinique comme nous la connaissons actuellement.

**Liens d'intérêts :** Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

1. Bang I. Ein Verfahren zur Mikrobestimmung von Blutbestandteilen. *Biochem Ztschr* 1913 ; 49 : 19-39.
2. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963 ; 32 : 338-43.
3. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr* 2001 ; 131 : 1631-6.
4. Costa X, Jardi R, Rodriguez F, Miravittles M, Cotrina M, Gonzalez C, *et al.* Simple method for alpha-1-antitrypsin deficiency screening by use of dried blood spot specimens. *Eur Respir J* 2000 ; 15 : 1111-5.
5. Xu H, Zhao Y, Liu Z, Zhu W, Zhou Y, Zhao Z. Bisulfite genomic sequencing of DNA from dried blood spot microvolume samples. *Forensic Sci Int Genet* 2012 ; 6 : 306-9.
6. Tuailon E, Mondain AM, Meroueh F, Ottomani L, Picot MC, Nagot N, *et al.* Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing. *Hepatology* 2010 ; 51 : 752-8.
7. Uttayamakul S, Likansakul S, Sunthornkachit R, Kuntiranont K, Louisirrotchanakul S, Chaovanich A, *et al.* Usage of dried blood spots for molecular diagnosis and monitoring HIV-1 infection. *J Virol Methods* 2005 ; 128 : 128-34.
8. Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Knowler WC, Goldstein DE. Measurement of glycosylated whole-blood protein for assessing glucose control in diabetes : collection and storage of capillary blood on filter paper. *Clin Chem* 1985 ; 31 : 213-6.
9. Caggana M, Conroy JM, Pass KA. Rapid, efficient method for multiplex amplification from filter paper. *Hum Mutat* 1998 ; 11 : 404-9.
10. Resnick L, Veren K, Salahuddin SZ, Tondreau S, Markham PD. Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments. *JAMA* 1986 ; 255 : 1887-91.

11. Parker SP, Cubitt WD. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *J Clin Pathol* 1999; 52 : 633-9.
12. Judd A, Parry J, Hickman M, McDonald T, Jordan L, Lewis K, *et al.* Evaluation of a modified commercial assay in detecting antibody to hepatitis C virus in oral fluids and dried blood spots. *J Med Virol* 2003; 71 : 49-55.
13. McDade TW, Williams S, Snodgrass JJ. What a drop can do : dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography* 2007; 44 : 899-925.
14. Garcia Boy R, Henseler J, Mattern R, Skopp G. Determination of morphine and 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. *Ther Drug Monit* 2008; 30 : 733-9.
15. Hollegaard MV, Grauholm J, Borglum A, Nyegaard M, Norgaard-Pedersen B, Orntoft T, *et al.* Genome-wide scans using archived neonatal dried blood spot samples. *BMC Genomics* 2009; 10 : 297-303.
16. O'Mara M, Hudson-Curtis B, Olson K, Yueh Y, Dunn J, Spooner N. The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis* 2011; 3 : 2335-47.
17. deWilde A, Sadilkova K, Sadilek M, Vasta V, Hahn SH. Tryptic peptide analysis of ceruloplasmin in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry : application to newborn screening. *Clin Chem* 2008; 54 : 1961-8.
18. Gohring K, Dietz K, Hartleif S, Jahn G, Hamprecht K. Influence of different extraction methods and PCR techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood spot (DBS) filter cards. *J Clin Virol* 2010; 48 : 278-81.
19. Strenger V, Pfuertscheller K, Wendelin G, Aberle SW, Nacheva EP, Zohrer B, *et al.* Differentiating inherited human herpesvirus type 6 genome from primary human herpesvirus type 6 infection by means of dried blood spot from the newborn screening card. *J Pediatr* 2011; 159 : 859-61.
20. de Almeida LM, Azevedo RS, Guimaraes AA, Coutinho Eda S, Struchiner CJ, Massad E. Detection of antibodies against hepatitis A virus in eluates of blood spotted on filter-paper : a pilot study in Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93 : 401-4.
21. De Crignis E, Re MC, Cimatti L, Zecchi L, Gibellini D. HIV-1 and HCV detection in dried blood spots by SYBR Green multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 2010; 165 : 51-6.
22. Snijdewind IJ, van Kampen JJ, Fraaij PL, van der Ende ME, Osterhaus AD, Gruters RA. Current and future applications of dried blood spots in viral disease management. *Antiviral Res* 2012; 93 : 309-21.
23. Lakshmy R, Gupta R. Measurement of glycosylated hemoglobin A1c from dried blood by turbidimetric immunoassay. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3 : 1203-6.
24. Fachiroh J, Prasetyanti PR, Paramita DK, Prasetyawati AT, Anggrahini DW, Haryana SM, *et al.* Dried-blood sampling for Epstein-Barr virus immunoglobulin G (IgG) and IgA serology in nasopharyngeal carcinoma screening. *J Clin Microbiol* 2008; 46 : 1374-80.
25. Hardelid P, Williams D, Dezateux C, Cubitt WD, Peckham CS, Tooke PA, *et al.* Agreement of rubella IgG antibody measured in serum and dried blood spots using two commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *J Med Virol* 2008; 80 : 360-4.
26. Balmaseda A, Saborio S, Tellez Y, Mercado JC, Perez L, Hammond SN, *et al.* Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. *J Clin Virol* 2008; 43 : 287-91.
27. Lehmann S, Hoofnagle A, Hochstrasser D, Brede C, Glueckmann M, Cocho JA, *et al.* Quantitative clinical chemistry proteomics (qCCP) using mass spectrometry : general characteristics and application. *Clin Chem Lab Med* 2012; 51 : 919-35.
28. Johansson J, Becker C, Persson NG, Fex M, Torn C. C-peptide in dried blood spots. *Scand J Clin Lab Invest* 2010; 70 : 404-9.
29. Chambers AG, Percy AJ, Yang J, Camenzind AG, Borchers CH. Multiplexed quantitation of endogenous proteins in dried blood spots by multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2012; 12 : 781-91.
30. Newman MS, Brandon TR, Groves MN, Gregory WL, Kapur S, Zava DT. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of 25-hydroxy vitamin D2 and 25-hydroxy vitamin D3 in dried blood spots : a potential adjunct to diabetes and cardiometabolic risk screening. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3 : 156-62.
31. Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, *et al.* Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots : a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 2001; 47 : 1945-55.
32. Quraishi R, Lakshmy R, Prabhakaran D, Mukhopadhyay AK, Jailkhani B. Use of filter paper stored dried blood for measurement of triglycerides. *Lipids Health Dis* 2006; 5 : 20-3.
33. Ruhaak LR, Miyamoto S, Kelly K, Lebrilla CB. N-Glycan profiling of dried blood spots. *Anal Chem* 2012; 84 : 396-402.
34. Blessborn D, Romsing S, Bergqvist Y, Lindegardh N. Assay for screening for six antimalarial drugs and one metabolite using dried blood spot sampling, sequential extraction and ion-trap detection. *Bioanalysis* 2010; 2 : 1839-47.
35. Henderson LO, Powell MK, Hannon WH, Bernert Jr. JT, Pass KA, Fernhoff P, *et al.* An evaluation of the use of dried blood spots from newborn screening for monitoring the prevalence of cocaine use among childbearing women. *Biochem Mol Med* 1997; 61 : 143-51.
36. D'Avolio A, Simiele M, Siccardi M, Baietto L, Sciandra M, Bonora S, *et al.* HPLC-MS method for the quantification of nine anti-HIV drugs from dry plasma spot on glass filter and their long term stability in different conditions. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 52 : 774-80.
37. McCabe ER, Huang SZ, Seltzer WK, Law ML. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters : potential applications to newborn screening. *Hum Genet* 1987; 75 : 213-6.
38. Makowski GS, Aslanzadeh J, Hopfer SM. In situ PCR amplification of Guthrie card DNA to detect cystic fibrosis mutations. *Clin Chem* 1995; 41 : 477-9.
39. Coffee B, Keith K, Albizua I, Malone T, Mowrey J, Sherman SL, *et al.* Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *Am J Hum Genet* 2009; 85 : 503-14.
40. Harahap NI, Harahap IS, Kaszynski RH, Nurputra DK, Hartomo TB, Pham HT, *et al.* Spinal muscular atrophy patient detection and carrier screening using dried blood spots on filter paper. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; 16 : 123-9.
41. Klotz J, Bryant P, Wilcox HB, Dillon M, Wolf B, Fagliano J. Population-based retrieval of newborn dried blood spots for researching paediatric cancer susceptibility genes. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006; 20 : 449-52.

42. Karthipan SN, George E, Jameela S, Lim WF, Teh LK, Lee TY, *et al.* An assessment of three noncommercial DNA extraction methods from dried blood spots for beta-thalassaemia mutation identification. *Int J Lab Hematol* 2011 ; 33 : 540-4.
43. Sjöholm MI, Dillner J, Carlson J. Assessing quality and functionality of DNA from fresh and archival dried blood spots and recommendations for quality control guidelines. *Clin Chem* 2007 ; 53 : 1401-7.
44. Lewensohn-Fuchs I, Osterwall P, Forsgren M, Malm G. Detection of herpes simplex virus DNA in dried blood spots making a retrospective diagnosis possible. *J Clin Virol* 2003 ; 26 : 39-48.
45. Jardi R, Rodriguez-Frias F, Buti M, Schaper M, Valdes A, Martinez M, *et al.* Usefulness of dried blood samples for quantification and molecular characterization of HBV-DNA. *Hepatology* 2004 ; 40 : 133-9.
46. Scanga L, Chaing S, Powell C, Aylsworth AS, Harrell LJ, Henshaw NG, *et al.* Diagnosis of human congenital cytomegalovirus infection by amplification of viral DNA from dried blood spots on perinatal cards. *J Mol Diagn* 2006 ; 8 : 240-5.
47. Yourno J, Conroy J. A novel polymerase chain reaction method for detection of human immunodeficiency virus in dried blood spots on filter paper. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 2887-92.
48. Barin F, Plantier JC, Brand D, Brunet S, Moreau A, Liandier B, *et al.* Human immunodeficiency virus serotyping on dried serum spots as a screening tool for the surveillance of the AIDS epidemic. *J Med Virol* 2006 ; 78 : 13-8.
49. Brindle E, Fujita M, Shofer J, O'Connor KA. Serum, plasma, and dried blood spot high-sensitivity C-reactive protein enzyme immunoassay for population research. *J Immunol Methods* 2010 ; 362 : 112-20.
50. Cowans NJ, Stamatopoulou A, Liitti P, Suonpaa M, Spencer K. The stability of free-beta human chorionic gonadotrophin and pregnancy-associated plasma protein-A in first trimester dried blood spots. *Prenat Diagn* 2011 ; 31 : 293-8.
51. Worthman CM, Stallings JF. Measurement of gonadotropins in dried blood spots. *Clin Chem* 1994 ; 40 : 448-53.
52. Hoffman DL. Purification and large-scale preparation of antithrombin III. *Am J Med* 1989 ; 87 : 23-6.
53. Mitchell ML, Hermos RJ, Moses AC. Radioimmunoassay of somatomedin-C in filter paper discs containing dried blood. *Clin Chem* 1987 ; 33 : 536-8.
54. Wang XL, Dudman NP, Blades BL, Wilcken DE. Changes in the immunoreactivity of Apo A-I during storage. *Clin Chim Acta* 1989 ; 179 : 285-93.
55. Macri JN, Anderson RW, Krantz DA, Larsen JW, Buchanan PD. Prenatal maternal dried blood screening with alpha-fetoprotein and free beta-human chorionic gonadotropin for open neural tube defect and Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1996 ; 174 : 566-72.
56. Yamaguchi A, Fukushi M, Arai O, Mizushima Y, Sato Y, Shimizu Y, *et al.* A simple method for quantification of biotinidase activity in dried blood spot and its application to screening of biotinidase deficiency. *Tohoku J Exp Med* 1987 ; 152 : 339-46.
57. Song EY, Vandunk C, Kuddo T, Nelson PG. Measurement of CGRP in dried blood spots using a modified sandwich enzyme immunoassay. *J Neurosci Methods* 2006 ; 155 : 92-7.
58. O'Broin SD, Gunter EW. Screening of folate status with use of dried blood spots on filter paper. *Am J Clin Nutr* 1999 ; 70 : 359-67.
59. Daniel YA, Turner C, Haynes RM, Hunt BJ, Dalton RN. Quantification of hemoglobin A2 by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007 ; 53 : 1448-54.
60. Jacomelli G, Micheli V, Peruzzi L, Notarantonio L, Cerboni B, Sestini S, *et al.* Simple non-radiochemical HPLC-linked method for screening for purine metabolism disorders using dried blood spot. *Clin Chim Acta* 2002 ; 324 : 135-9.
61. Wang D, Wood T, Sadilek M, Scott CR, Turecek F, Gelb MH. Tandem mass spectrometry for the direct assay of enzymes in dried blood spots : application to newborn screening for mucopolysaccharidosis II (Hunter disease). *Clin Chem* 2007 ; 53 : 137-40.
62. Diamandi A, Khosravi MJ, Mistry J, Martinez V, Guevara-Aguirre J. Filter paper blood spot assay of human insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 and preliminary application in the evaluation of growth hormone status. *J Clin Endocrinol Metab* 1998 ; 83 : 2296-301.
63. Fisher RS, Chan DW, Bare M, Lesser RP. Capillary prolactin measurement for diagnosis of seizures. *Ann Neurol* 1991 ; 29 : 187-90.
64. McDade TW, Shell-Duncan B. Whole blood collected on filter paper provides a minimally invasive method for assessing human transferrin receptor level. *J Nutr* 2002 ; 132 : 3760-3.
65. Zimmermann MB, Moretti D, Chaouki N, Torresani T. Development of a dried whole-blood spot thyroglobulin assay and its evaluation as an indicator of thyroid status in goitrous children receiving iodized salt. *Am J Clin Nutr* 2003 ; 77 : 1453-8.
66. Mwaba P, Cassol S, Pilon R, Chintu C, Janes M, Nunn A, *et al.* Use of dried whole blood spots to measure CD4+ lymphocyte counts in HIV-1-infected patients. *Lancet* 2003 ; 362 : 1459-60.
67. Helfand RF, Keyserling HL, Williams I, Murray A, Mei J, Moscatello C, *et al.* Comparative detection of measles and rubella IgM and IgG derived from filter paper blood and serum samples. *J Med Virol* 2001 ; 65 : 751-7.
68. Sorensen T, Spenter J, Jaliashvili I, Christiansen M, Norgaard-Pedersen B, Petersen E. Automated time-resolved immunofluorometric assay for *Toxoplasma gondii*-specific IgM and IgA antibodies : study of more than 130,000 filter-paper blood-spot samples from newborns. *Clin Chem* 2002 ; 48 : 1981-6.
69. Dowlati B, Dunhardt PA, Smith MM, Shaheb S, Stuart CA. Quantification of insulin in dried blood spots. *J Lab Clin Med* 1998 ; 131 : 370-4.
70. Chamoles NA, Niizawa G, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Glycogen storage disease type II : enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2004 ; 347 : 97-102.
71. Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C. Hurler-like phenotype : enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 2098-102.
72. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Diagnosis of alpha-L-iduronidase deficiency in dried blood spots on filter paper : the possibility of newborn diagnosis. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 780-1.
73. ten Brink HJ, van den Heuvel CM, Christensen E, Largilliere C, Jakobs C. Diagnosis of peroxisomal disorders by analysis of phytanic and pristanic acids in stored blood spots collected at neonatal screening. *Clin Chem* 1993 ; 39 : 1904-6.
74. Vladutiu GD, Glueck CJ, Schultz MT, McNeely S, Guthrie R. beta-Lipoprotein quantitation in cord blood spotted on filter paper : a screening test. *Clin Chem* 1980 ; 26 : 1285-90.

75. Laberge C, Grenier A, Valet JP, Morissette J. Fumarylacetoacetase measurement as a mass-screening procedure for hereditary tyrosinemia type I. *Am J Hum Genet* 1990 ; 47 : 325-8.
76. Skogstrand K, Ekelund CK, Thorsen P, Vogel I, Jacobsson B, Norgaard-Pedersen B, *et al.* Effects of blood sample handling procedures on measurable inflammatory markers in plasma, serum and dried blood spot samples. *J Immunol Methods* 2008 ; 336 : 78-84.
77. Tanner S, McDade TW. Enzyme immunoassay for total immunoglobulin E in dried blood spots. *Am J Hum Biol* 2007 ; 19 : 440-2.
78. Chamoles NA, Blanco MB, Iorcansky S, Gaggioli D, Specola N, Casentini C. Retrospective diagnosis of GM1 gangliosidosis by use of a newborn-screening card. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 2068-70.
79. Xu YY, Pettersson K, Blomberg K, Hemmila I, Mikola H, Lovgren T. Simultaneous quadruple-label fluorometric immunoassay of thyroid-stimulating hormone, 17 alpha-hydroxyprogesterone, immunoreactive trypsin, and creatine kinase MM isoenzyme in dried blood spots. *Clin Chem* 1992 ; 38 : 2038-43.
80. Dussault JH, Morissette J, Letarte J, Guyda H, Laberge C. Thyroxine-binding globulin capacity and concentration evaluated from blood spots on filter-paper in a screening program for neonatal hypothyroidism. *Clin Chem* 1980 ; 26 : 463-5.
81. Kirby LT, Applegarth DA, Davidson AG, Wong LT, Hardwick DF. Use of a dried blood spot in immunoreactive-trypsin assay for detection of cystic fibrosis in infants. *Clin Chem* 1981 ; 27 : 678-9.
82. Gil A, Gonzalez A, Dal-Re R, Dominguez V, Astasio P, Aguilar L. Detection of antibodies against hepatitis A in blood spots dried on filter paper. Is this a reliable method for epidemiological studies ? *Epidemiol Infect* 1997 ; 118 : 189-91.
83. Villar LM, de Oliveira JC, Cruz HM, Yoshida CF, Lampe E, Lewis-Ximenez LL. Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers. *J Med Virol* 2011 ; 83 : 1522-9.
84. Tappin DM, Greer K, Cameron S, Kennedy R, Brown AJ, Girdwood RW. Maternal antibody to hepatitis B core antigen detected in dried neonatal blood spot samples. *Epidemiol Infect* 1998 ; 121 : 387-90.
85. Parker SP, Khan HI, Cubitt WD. Detection of antibodies to hepatitis C virus in dried blood spot samples from mothers and their offspring in Lahore. *Pakistan. J Clin Microbiol* 1999 ; 37 : 2061-3.
86. Corran PH, Cook J, Lynch C, Leendertse H, Manjurano A, Griffin J, *et al.* Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies. *Malar J* 2008 ; 7 : 195-6.
87. Thanasekaraan V, Wiseman MS, Rayner RJ, Hiller EJ, Shale DJ. *Pseudomonas aeruginosa* antibodies in blood spots from patients with cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1989 ; 64 : 1599-603.
88. Hofman LF, Foley TP, Henry JJ, Naylor EW. The use of filter paper-dried blood spots for thyroid-antibody screening in adults. *J Lab Clin Med* 2004 ; 144 : 307-12.
89. Hong HA, Ke NT, Nhon TN, Thinh ND, van der Gun JW, Hendriks JT, *et al.* Validation of the combined toxin-binding inhibition test for determination of neutralizing antibodies against tetanus and diphtheria toxins in a vaccine field study in Viet Nam. *Bull World Health Organ* 1996 ; 74 : 275-82.
90. Takkouche B, Iglesias J, Alonso-Fernandez JR, Fernandez-Gonzalez C, Gestal-Otero JJ. Detection of Brucella antibodies in eluted dried blood : a validation study. *Immunol Lett* 1995 ; 45 : 107-8.
91. Peralta RH, Macedo HW, Vaz AJ, Machado LR, Peralta JM. Detection of anti-cysticercus antibodies by ELISA using whole blood collected on filter paper. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 ; 95 : 35-6.
92. de la Fuente L, Toro C, Soriano V, Brugal MT, Vallejo F, Barrio G, *et al.* HTLV infection among young injection and non-injection heroin users in Spain : prevalence and correlates. *J Clin Virol* 2006 ; 35 : 244-9.
93. Fenollar F, Raoult D. Diagnosis of rickettsial diseases using samples dried on blotting paper. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999 ; 6 : 483-8.
94. Stevens R, Pass K, Fuller S, Wiznia A, Noble L, Duva S, *et al.* Blood spot screening and confirmatory tests for syphilis antibody. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 2353-8.
95. Backhouse JL. Dried blood spot technique for detecting Treponema infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998 ; 92 : 469-70.
96. Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. *Bull World Health Organ* 1990 ; 68 : 465-71.
97. Mason PR, Fiori PL, Cappuccinelli P, Rappelli P, Gregson S. Seroepidemiology of *Trichomonas vaginalis* in rural women in Zimbabwe and patterns of association with HIV infection. *Epidemiol Infect* 2005 ; 133 : 315-23.
98. Fujimoto A, Okano Y, Miyagi T, Isshiki G, Oura T. Quantitative Beutler test for newborn mass screening of galactosemia using a fluorometric microplate reader. *Clin Chem* 2000 ; 46 : 806-10.
99. Sorensen KM, Agergaard P, Olesen C, Andersen PS, Larsen LA, Ostergaard JR, *et al.* Detecting 22q11.2 deletions by use of multiplex ligation-dependent probe amplification on DNA from neonatal dried blood spot samples. *J Mol Diagn* 2010 ; 12 : 147-51.
100. Waterboer T, Dondog B, Michael KM, Michel A, Schmitt M, Vaccarella S, *et al.* Dried blood spot samples for seroepidemiology of infections with human papillomaviruses, *Helicobacter pylori*, hepatitis C virus, and JC virus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012 ; 21 : 287-93.
101. Accinni R, Campolo J, Parolini M, De Maria R, Caruso R, Maiorana A, *et al.* Newborn screening of homocystinuria : quantitative analysis of total homocyst(e)ine on dried blood spot by liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003 ; 785 : 219-26.
102. Burrin JM, Price CP. Performance of three enzymic methods for filter paper glucose determination. *Ann Clin Biochem* 1984 ; 21 : 411-6.
103. Lacey JM, Minutti CZ, Magera MJ, Tauscher AL, Casetta B, McCann M, *et al.* Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2004 ; 50 : 621-5.
104. Erhardt JG, Craft NE, Heinrich F, Biesalski HK. Rapid and simple measurement of retinol in human dried whole blood spots. *J Nutr* 2002 ; 132 : 318-21.
105. Chace DH, Singleton S, Diperna J, Aiello M, Foley T. Rapid metabolic and newborn screening of thyroxine (T4) from dried blood spots by MS/MS. *Clin Chim Acta* 2009 ; 403 : 178-83.
106. Pacchiarotti A, Bartalena L, Falcone M, Buratti L, Grasso L, Martino E, *et al.* Free thyroxine and free triiodothyronine measurement in dried blood spots on filter paper by column adsorption chromatography followed by radioimmunoassay. *Horm Metab Res* 1988 ; 20 : 293-7.

- 107.** Schulze A, Schmidt C, Kohlmüller D, Hoffmann GF, Mayatepek E. Accurate measurement of free carnitine in dried blood spots by isotope-dilution electrospray tandem mass spectrometry without butylation. *Clin Chim Acta* 2003 ; 335 : 137-45.
- 108.** Kuhara T, Ohse M, Inoue Y, Yorifuji T, Sakura N, Mitsubuchi H, *et al.* Gas chromatographic-mass spectrometric newborn screening for propionic acidemia by targeting methylcitrate in dried filter-paper urine samples. *J Inherit Metab Dis* 2002 ; 25 : 98-106.
- 109.** Kimura M, Yoon HR, Wasant P, Takahashi Y, Yamaguchi S. A sensitive and simplified method to analyze free fatty acids in children with mitochondrial beta oxidation disorders using gas chromatography/mass spectrometry and dried blood spots. *Clin Chim Acta* 2002 ; 316 : 117-21.
- 110.** Allard P, Grenier A, Korson MS, Zytovicz TH. Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry : analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. *Clin Biochem* 2004 ; 37 : 1010-5.
- 111.** Carducci C, Santagata S, Leuzzi V, Artiola C, Giovannello T, Battini R, *et al.* Quantitative determination of guanidinoacetate and creatine in dried blood spot by flow injection analysis-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006 ; 364 : 180-7.
- 112.** Koal T, Burhenne H, Romling R, Svoboda M, Resch K, Kaever V. Quantification of antiretroviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005 ; 19 : 2995-3001.
- 113.** Henderson LO, Powell MK, Hannon WH, Miller BB, Martin ML, Hanzlick RL, *et al.* Radioimmunoassay screening of dried blood spot materials for benzoyllecgonine. *J Anal Toxicol* 1993 ; 17 : 42-7.
- 114.** Lindkvist J, Malm M, Bergqvist Y. Straightforward and rapid determination of sulfadoxine and sulfamethoxazole in capillary blood on sampling paper with liquid chromatography and UV detection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009 ; 103 : 371-6.
- 115.** Burse VW, DeGuzman MR, Korver MP, Najam AR, Williams CC, Hannon WH, *et al.* Preliminary investigation of the use of dried-blood spots for the assessment of in utero exposure to environmental pollutants. *Biochem Mol Med* 1997 ; 61 : 236-9.
- 116.** Li PK, Lee JT, Conboy KA, Ellis EF. Fluorescence polarization immunoassay for theophylline modified for use with dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 1986 ; 32 : 552-5.
- 117.** Conroy JM, Trivedi G, Sovd T, Caggana M. The allele frequency of mutations in four genes that confer enhanced susceptibility to venous thromboembolism in an unselected group of New York State newborns. *Thromb Res* 2000 ; 99 : 317-24.
- 118.** Bobillo Lobato J, Sanchez Peral BA, Duran Parejo P, Jimenez Jimenez LM. Detection of c. -32T>G (IVS1-13T>G) mutation of Pompe disease by real-time PCR in dried blood spot specimen. *Clin Chim Acta* 2013 ; 418 : 107-8.
- 119.** Chien YH, Lee NC, Chiang SC, Desnick RJ, Hwu WL. Fabry disease : incidence of the common later-onset alpha-galactosidase A IVS4+919G->A mutation in Taiwanese newborns—superiority of DNA-based to enzyme-based newborn screening for common mutations. *Mol Med* 2012 ; 18 : 780-4.
- 120.** Abdallah MW, Larsen N, Grove J, Bonefeld-Jorgensen EC, Nørgaard-Pedersen B, Hougaard DM, *et al.* Neonatal chemokine levels and risk of autism spectrum disorders : findings from a Danish historic birth cohort follow-up study. *Cytokine* 2012 ; 61 : 370-6.
- 121.** McCandless SE, Chandrasekar R, Linard S, Kikano S, Rice L. Sequencing from dried blood spots in infants with “false positive” newborn screen for MCAD deficiency. *Mol Genet Metab* 2013 ; 108 : 51-5.
- 122.** Cordovado SK, Hendrix M, Greene CN, Mochal S, Earley MC, Farrell PM, *et al.* CFTR mutation analysis and haplotype associations in CF patients. *Mol Genet Metab* 2012 ; 105 : 249-54.